

## 淀粉磷酸化酶原核表达及单克隆抗体的制备

余厚美,安飞飞,罗秀芹,陈松笔,欧文军

(中国热带农业科学院热带作物品种资源研究所/农业部木薯种质资源保护与利用重点实验室,海南儋州 571737)

**摘要:**旨在体外表达淀粉磷酸化酶,免疫小鼠制备单克隆抗体。用PCR扩增木薯淀粉磷酸化酶基因,将其克隆到原核表达载体(*pET28a*)中,经*E.coli*表达纯化淀粉磷酸化酶。用纯化的淀粉磷酸化酶蛋白免疫Bab/c小鼠,间接ELISA测定小鼠血清效价,取小鼠脾细胞与小鼠SP2/0细胞融合,制备能产生抗淀粉磷酸化酶单克隆抗体的杂交瘤细胞株,并检测其亚型和抗体稳定性。重组质粒在*E.coli*中能高效表达淀粉磷酸化酶,免疫小鼠后取效价高的3#小鼠脾脏细胞和SP2/0细胞融合,共获得15株抗体效价均达到 $10^5$ 以上,能稳定分泌抗淀粉磷酸化酶抗体的细胞株,与钙调蛋白、牛血清白蛋白无交叉反应,抗体亚型鉴定其中13株为IgG型抗体,其中2株抗体性能非常稳定。本实验制备的淀粉磷酸化酶单克隆抗体效价高、特异性强、稳定性好,为后续木薯中淀粉磷酸化酶研究奠定基础。

**关键词:**木薯;淀粉磷酸化酶;蛋白表达;单克隆抗体

中图分类号:S-3

文献标志码:A

论文编号:casb16060044

### Starch Phosphorylase Prokaryotic Expression and Preparation of Monoclonal Antibodies

Yu Houmei, An Feifei, Luo Xiuqin, Chen Songbi, Ou Wenjun

(Tropical Crops Genetic Resources Institute, Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences/Key Laboratory of Ministry of Agriculture for Germplasm Resources Conservation and Utilization of Cassava, Danzhou Hainan 571737)

**Abstract:** The aims are to express starch phosphorylase *in vitro*, and prepare monoclonal antibodies in immunized mice. Starch phosphorylase genes of cassava were amplified by polymerase chain reaction (PCR) and then cloned into the prokaryotic expression vector (*pET28a*), the starch phosphorylase was expressed in *E. coli* and then purified. The purified starch phosphorylase was used to immunize Bab/c mice and the titer of mice serum was determined by indirect ELISA. Mouse spleen cells and murine SP2/0 cells were fused, and then hybridoma cell lines which could produce starch phosphorylase monoclonal antibody were prepared, the subtypes and stability of antibody were detected. Recombinant plasmid in *E. coli* could express starch phosphorylase efficiently, SP2/0 cells and spleen cells of 3# mice were fused, then 15 strains with antibody titer more than  $10^5$  were obtained, and the antibodies could against starch phosphorylase stably, and there was no cross reaction with calmodulin and bovine serum albumin, in which 13 strains were IgG type, and 2 strains were very stable. The monoclonal antibody of starch phosphorylase had high titer, strong specificity, and good stability, it could provide a basis for starch phosphorylase study on cassava.

**Key words:** cassava; starch phosphorylase; protein expression; monoclonal antibody

### 0 引言

木薯是一种全球性的高淀粉能源作物,素有“地下

粮仓”和“淀粉之王”的美誉<sup>[1-2]</sup>,也是一种很有发展潜力的可再生资源作物。作为粮食和新兴的生物能源作物

**基金项目:**中央级公益性科研院所基本科研业务费专项“淀粉磷酸化酶快速检测方法建立及在木薯块根淀粉含量测定中的应用”(NO.0315014)。

**第一作者简介:**余厚美,女,1984年出生,贵州瓮安人,研究实习员,硕士,研究方向为抗体制备及快速检测方法的研究。通信地址:571737 海南省儋州市宝岛新村 中国热带农业科学院热带作物品种资源研究所, Tel:0898-23300582, E-mail:yuhoumei@sina.com。

**通讯作者:**欧文军,男,1974年出生,湖南汝城人,副研究员,博士,主要从事木薯种质资源研究。通信地址:571737 海南省儋州市宝岛新村 中国热带农业科学院热带作物品种资源研究所, Tel:0898-23300125, E-mail:cassava6973@163.com。

**收稿日期:**2016-06-08, **修回日期:**2016-08-22。

而备受关注<sup>[3]</sup>,其块根淀粉含量对加工利用意义重大。淀粉的合成与分解受一系列酶的催化调控,包括淀粉磷酸化酶(Starch phosphorylase, Pho, SP)、淀粉合成酶、淀粉分支酶、淀粉去分支酶、ADP-葡萄糖焦磷酸化酶等<sup>[4-5]</sup>。SP是一种重要的淀粉合成代谢相关酶,首先在玉米胚乳的基质中发现,是一种112 kD的蛋白质<sup>[6]</sup>,在马铃薯中该蛋白的分子量为160 kD<sup>[7]</sup>。在高等植物中的SP有两种同工酶,质体型和胞质型,质体型分子量大于100 kD,胞质型分子质量约为90 kD。SP可将直链淀粉或者支链淀粉非还原端 $\alpha$ -1,4糖苷键磷酸化,产生葡萄糖-1磷酸,在变构酶的作用下生成葡萄糖-6磷酸进入糖酵解途径<sup>[8]</sup>。袁亚芳<sup>[6]</sup>通过Northern和RT-PCR技术研究了质体型和胞质型2种同工型SP基因在不同水稻品种和不同器官中的表达特性,研究发现2种类型的SP在根、叶和萌发的种子中都几乎没有表达,都只在开花后发育的种子中表达,质体型表达较高,胞质型只有微量表达,而且所有水稻品种中质体型表达量都要高于胞质型,抑制质体型基因的表达可明显降低淀粉RNA谱中的峰值粘度等指标。贮藏器官中其他淀粉合成酶的表达在一定程度上也影响SP的活性,如Lloyd等<sup>[9]</sup>在降低马铃薯块根中可溶性淀粉酶的活性后,磷酸化淀粉含量明显降低;Abel等<sup>[10]</sup>抑制可溶性淀粉酶III表达时,马铃薯中磷酸含量增加70%。SP在玉米<sup>[11-12]</sup>、菠菜<sup>[13]</sup>、豌豆<sup>[14]</sup>中都证明和淀粉合成有密切的关系。根据近几年的研究显示,在淀粉合成的整个过程中都存在有淀粉的磷酸化,即有磷酸体以单酯化形式结合到淀粉上,而淀粉磷酸化酶在形成磷酸酯的过程中起着决定作用<sup>[6]</sup>。门福义等<sup>[15]</sup>研究的SP在马铃薯淀粉合成运转中起重要的促进作用,其活性在淀粉形成的不同时期和不同温度下表现不同的调节作用。免疫学方法检测木薯中SP的表达量对木薯淀粉的影响目前未见相关报道,免疫学检测分析方法具有快速、特异性高、简单等优点,在人类疾病诊断<sup>[16-17]</sup>、畜牧养殖疾病诊断<sup>[18-19]</sup>和食品安全检测<sup>[20-22]</sup>等领域发展迅速。本研究以木薯SP为研究对象,体外表达SP,免疫小鼠制备单克隆抗体,为后续用免疫学方法检测SP和其在淀粉形成过程中的调控研究奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 主要原料与试剂

实验所需TaqDNA聚合酶、连接酶、限制性内切酶均购自北京索莱宝公司;质粒、*E.coli*来自国家菌种保藏中心;HRP-羊抗鼠、融合剂、抗体亚型鉴定试剂盒购自美国sigma;QuickAntibody-mouse 5w佐剂、clone easy培养基购自北京博奥龙免疫技术有限公司;L-谷氨酰胺、胎

牛血清、DMEM不完全培养基、HT、HAT、DMSO、青霉素-链霉素购自GIBCO;碳酸氢钠、碳酸钠、磷酸二氢钠、磷酸氢二钠、氯化钠、氯化钾、甘油等化学试剂购自国药集团化学试剂有限公司;Bab1/c小鼠购自汕头大学医学中心;SP2/0为本实验室保存。实验在中国热带农业科学院热带作物品种资源研究所农业部木薯种质资源保护与利用重点实验室,于2015年3月—2016年5月进行。

### 1.2 方法

1.2.1 pET28a(+)-Pho基因重组质粒的构建 设计Pho序列引物为:5'-CGCGGATCCAAGTGC GTG TTGGATGAGACGA-3';5'-CCGCTCGAGCTCC TCCCATTTAACATATT CA-3',分别引入酶切位点BamH I/Xho I,以木薯cDNA为模板进行PCR扩增出所需片段。表达载体pET28a(+)用BamH I/Xho I双酶切后,与SP目的基因的酶切产物于16℃连接12 h。取5  $\mu$ L连接产物转入感受态大肠杆菌DH5 $\alpha$ 中,接种LB卡那霉素抗性固体培养基,37℃培养过夜,挑取单克隆至1.5 mL卡那霉素LB液体培养基中,37℃ 200 r/min培养过夜,取质粒进行测序鉴定。

1.2.2 pET28a(+)-SP基因原核表达与鉴定 将测序正确的质粒pET28a(+)-SP转化到宿主菌*E.coli* BL21中,用1.0 mmol/L IPTG诱导表达,收集的菌在4℃用超声波破菌仪裂解菌体并高速离心收集上清和沉淀并进行分析。加入等体积2 $\times$ SDS凝胶上样缓冲液,100℃煮沸3 min,冰浴4 min,室温12000 r/min离心1 min,取20  $\mu$ L进行SDS-PAGE电泳,考马斯亮蓝染色,通过凝胶成像系统检测表达产量。Western blot检测重组pET28a(+)-SP蛋白,SDS-PAGE后转移至NC膜,用5%脱脂奶粉的PBST封闭;加1:1000稀释的抗His标签单克隆抗体室温轻摇作用1 h;PBST洗涤3次;加入1:3000稀释的AP标记羊抗鼠IgG室温反应1 h,洗涤同上;BCIP/NBT底物显色。

1.2.3 pET28a(+)-SP蛋白纯化 离心后的菌用8 mol/L尿素变性增溶,经Ni-NTA琼脂糖亲和柱分离纯化目的蛋白,分别收集穿透和洗脱蛋白,纯化蛋白经透析法复性,尿素浓度梯度依次为6、4、2、1、0.25、0.1、0 mol/L,每个浓度透析时间为12 h。

1.2.4 SP免疫小鼠 纯化后的SP按50  $\mu$ g/鼠的剂量免疫5只小鼠。无菌取出250  $\mu$ L QuickAntibody-mouse 5w佐剂,与含250  $\mu$ g SP蛋白的250  $\mu$ L生理盐水的混合物迅速混匀,通过小鼠后腿肌肉注射免疫小鼠,每只小鼠注射100  $\mu$ L,第21天按同样方式加强免疫1针,第35天小鼠断尾采血,全血4℃过夜,4℃ 10000 r/min离心10 min,收集血清,ELISA间接法测血清效价。

1.2.5 SP单克隆抗体的制备 挑选效价高的免疫小鼠按50 μg/鼠的剂量腹腔加强免疫,72 h左右摘眼球取全血,70%酒精中浸泡5~10 min,无菌条件下取出小鼠脾脏,分离脾细胞后和SP2/0细胞混合,室温2000 r/min离心5 min后在50% PEG作用下融合,HAT筛选培养,7~9天用间接ELISA检测细胞上清,阳性细胞用有限稀释法克隆细胞,直至阳性单克隆率为100%,小鼠体内诱生腹水法制备抗体,将阳性杂交瘤细胞于液氮中长期保存。

1.2.6 抗体的效价测定 抗体效价的测定用棋盘法,SP用0.05 mol/L pH 9.6的碳酸盐缓冲液梯度包被,100 μL/孔,4℃过夜,PBST+5%小牛血清150 μL/孔封闭,加100 μL/孔梯度稀释的抗体,37℃反应30 min,洗涤液洗涤4~5次,加100 μL/孔酶标羊抗鼠抗体,37℃反应30 min,洗涤液洗涤4~5次,TMB底物液37℃反应15 min,0.5 mol/L H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>终止反应。选择阳性吸光度值大于阴性吸光度值的2.1倍时,抗原抗体的稀释倍数为抗原抗体的效价。

1.2.7 腹水的纯化 新采集的腹水4℃过夜,4℃10000 r/min离心10 min,收集上清,再用滤纸滤去脂质,滤液用0.05 mol/L pH 4.0的醋酸盐缓冲液4倍稀释,氢氧化钠调至pH 4.5,逐滴加入1%体积辛酸,室温搅拌30 min后8000 r/min离心30 min,收集的上清在冰浴条件下等体积加入饱和硫酸铵,冰浴搅拌30 min后静置过夜,6000 r/min离心20 min,沉淀用0.02 mol/L pH 7.2的PBS透析72 h后分装,-20℃冻存。

1.2.8 抗体特异性和亚型测定 分别在酶标板上包被SP、钙调蛋白、牛血清白蛋白,用上述检测抗体的方法检测抗体的特异性。抗体亚型用购买的分型试剂盒根据说明书进行检测。

1.2.9 抗体的稳定性测定 将所有纯化后IgG型的抗体置-20℃反复冻融5次、4℃保存30天,37℃作用7天,56℃作用30 min,比较处理前后抗体效价的变化情况。

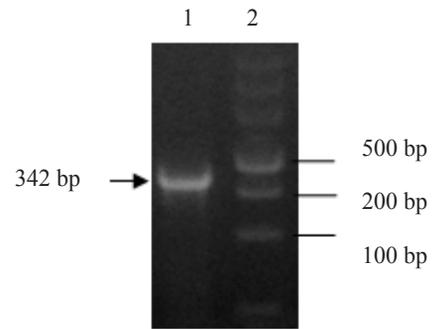
## 2 结果与分析

### 2.1 重组质粒的构建

PCR法从木薯基因中获得SP基因片段,经1%琼脂糖凝胶电泳后342 bp的目的条带清晰可见,结果如图1所示,与预期大小相同,同时提取阳性克隆质粒测序鉴定验证了序列的准确性。

### 2.2 SDS-PAGE及Western blot分析

将测序正确的pET28a(+)-SP质粒转化至*E.coli* BL21感受态细胞内。1.0 mmol/L IPTG诱导6 h后,表达蛋白经12% SDS-PAGE,诱导后的菌液在相对分子质量约为61 kD处出现明显目的条带,未经诱导的菌液上清



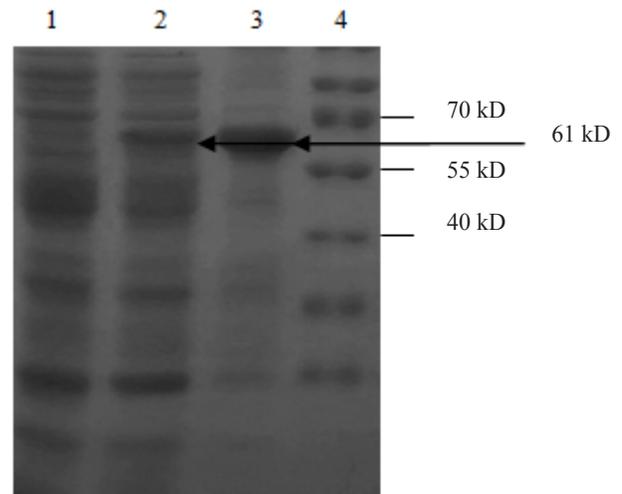
1:PCR回收片段;2:Marker

图1 PCR扩增的SP基因片段

无相应条带,如图2所示。说明pET28a(+)-SP在*E.coli* BL21中表达的是融合蛋白,总分子量为61 kD,表达蛋白破菌后几乎都存在于沉淀中,为包涵体表达。电泳分离的蛋白转印到NC膜,以抗His标签抗体作为第一抗体,HRP标记的羊抗鼠抗体为第二抗体,对表达产物进行Western blot分析,得到的特异性蛋白的相对分子质量约为61 kD,如图3所示,说明蛋白表达成功。

### 2.3 小鼠血清效价检测结果

通过间接ELISA法对小鼠血清的效价进行检测,用免疫前小鼠的血清作为阴性对照,抗原包被



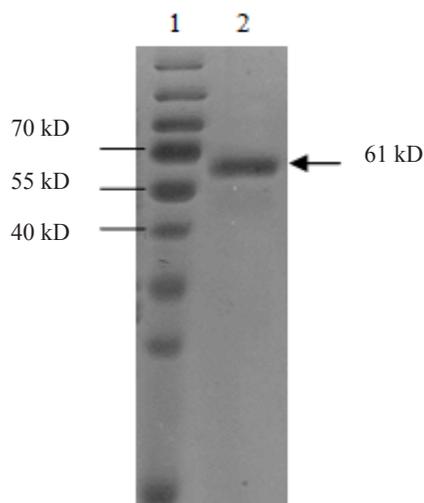
1:上清;2:表达上清;3:包含体;4:Marker

图2 表达后电泳

1 μg/mL,5只小鼠血清分别稀释10000,30000,50000,100000,150000倍,得到5只小鼠血清效价如图4所示,对BSA、OVA等蛋白均无交叉反应,挑选效价高的3#小鼠无菌取脾脏和SP2/0细胞进行细胞融合。

### 2.4 抗体纯化后效价、亚型测定和特异性测定

融合后的细胞经过2~4次的有限稀释法克隆和间接ELISA方法筛选得到15株阳性单克隆细胞,15株阳性单克隆细胞分别体外诱导法制备腹水。15株抗体效价均达到10<sup>5</sup>及以上,其中2H5和2E9为IgM型,1C7



1:Marker;2:上清纯化产物

图3 Western blot 结果

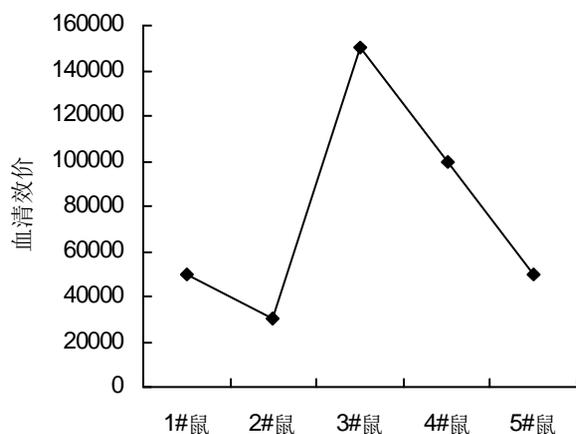


图4 小鼠血清效价检测

和3D2为IgG2a型,1F9为IgG2b型,其余抗体均为IgG1型,结果见表1。抗体特异性检测结果为:只有包被SP抗原的酶标板显色,包被钙调蛋白、牛血清白蛋

白的板孔均不显色,说明该抗体为SP的特异性抗体。

### 2.5 抗体稳定性

13株IgG型的抗体热稳定性效价检测结果见表2,所有抗体在56℃处理30 min都有不同程度的失活,大部分抗体在-20℃冻融5次和在4℃保存30天活性下降不明显,其中2A2和3D2活性下降相对较少,说明该抗体活性稳定。

表1 纯化后腹水效价和亚型测定

细胞株编号	抗体纯化后效价	抗体亚型
1D3	$3.0 \times 10^6$	IgG1
1F5	$2.0 \times 10^6$	IgG1
1C7	$5.1 \times 10^5$	IgG2a
1A8	$4.0 \times 10^6$	IgG1
1F9	$2.0 \times 10^6$	IgG2b
2A2	$8.0 \times 10^6$	IgG1
2H5	$1.0 \times 10^5$	IgM
2E9	$4.5 \times 10^6$	IgM
2D11	$1.0 \times 10^6$	IgG1
3D2	$4.0 \times 10^6$	IgG2a
3C6	$1.0 \times 10^6$	IgG1
4A8	$2.0 \times 10^6$	IgG1
5D6	$1.0 \times 10^6$	IgG1
5C12	$2.6 \times 10^5$	IgG1
6C12	$1.0 \times 10^6$	IgG1

### 3 讨论

通过将SP蛋白质编码序列克隆到原核表达载体(pET28a)中用*E.coli*表达,超声破碎后经镍柱纯化,获得较高纯度的融合SP,证实了在*E.coli*中原核表达并获得高纯度SP融合蛋白是可行的。

表2 不同温度对抗体效价的影响

抗体编号	处理前效价	-20℃冻融5次	4℃ 30 d	37℃ 7 d	56℃ 30 min
1D3	$3.0 \times 10^6$	$3.0 \times 10^6$	$3.0 \times 10^6$	$1.0 \times 10^6$	$5.1 \times 10^5$
1F5	$2.0 \times 10^6$	$1.0 \times 10^6$	$2.0 \times 10^6$	$1.0 \times 10^6$	$1.0 \times 10^6$
1C7	$5.1 \times 10^5$	$2.6 \times 10^5$	$5.1 \times 10^5$	$1.3 \times 10^5$	$6.4 \times 10^4$
1A8	$4.0 \times 10^6$	$4.0 \times 10^6$	$4.0 \times 10^6$	$1.0 \times 10^6$	$1.3 \times 10^5$
1F9	$2.0 \times 10^6$	$2.0 \times 10^6$	$1.0 \times 10^6$	$1.3 \times 10^5$	$3.2 \times 10^4$
2A2	$8.0 \times 10^6$	$8.0 \times 10^6$	$8.0 \times 10^6$	$4.0 \times 10^6$	$4.0 \times 10^6$
2D11	$1.0 \times 10^6$	$5.1 \times 10^5$	$1.0 \times 10^6$	$6.4 \times 10^4$	$1.6 \times 10^4$
3D2	$4.0 \times 10^6$	$4.0 \times 10^6$	$4.0 \times 10^6$	$3.0 \times 10^6$	$2.0 \times 10^6$
3C6	$1.0 \times 10^6$	$5.1 \times 10^5$	$1.0 \times 10^6$	$6.4 \times 10^4$	$1.6 \times 10^4$
4A8	$2.0 \times 10^6$	$2.0 \times 10^6$	$1.0 \times 10^6$	$1.3 \times 10^5$	$1.3 \times 10^5$
5D6	$1.0 \times 10^6$	$0.5 \times 10^6$	$1.0 \times 10^6$	$1.3 \times 10^5$	$2.6 \times 10^5$
5C12	$2.6 \times 10^5$	$6.4 \times 10^4$	$1.3 \times 10^5$	$1.6 \times 10^4$	$1.6 \times 10^4$
6C12	$1.0 \times 10^6$	$1.0 \times 10^6$	$1.0 \times 10^6$	$1.3 \times 10^5$	$1.3 \times 10^5$

本实验用免乳化的 QuickAntibody-mouse 5w 佐剂加抗原混合免疫小鼠,该佐剂因为不乳化,一是避免了使用常用弗氏佐剂乳化过程中对抗原位点的挤压改变,从而保证了抗原位点的天然结构,这样蛋白刺激小鼠产生的抗体才能更加接近于蛋白的天然结构、效价更高、特异性更强,避免了抗原本身位点发生变化产生的抗体不能应用在实际样本检测中的尴尬局面;二是该佐剂免每次疫小鼠只在后腿肌肉注射一针,不用在背部肌肉多点注射,体现了动物的保护福利;三是只需要2次免疫,比常规方法更节省抗原,更省成本<sup>[23]</sup>。

在杂交瘤细胞培养的各个阶段都加入了含细胞生长因子的饲养细胞替代品 clone easy,省去了制备小鼠腹腔细胞作为饲养细胞的工作、减少制备腹腔细胞作为饲养细胞实验过程中带来的污染、以及不杀小鼠取腹腔巨噬细胞体现的动物福利。

亚型测定中鉴定出的2株 IgM,可能是免疫周期短、加强免疫后第3天就融合、二抗特异性不够强等因素引起的,动物在免疫初期最先产生的抗体类型是 IgM,随着免疫次数增加、时间的推延,产生的 IgM 含量减少而 IgG 含量增加,本实验可能是免疫周期太短,虽有大量 IgG 产生,但是产生 IgM 的 B 细胞还存在,所以筛选到 IgM 抗体。

在对13株抗体进行热稳定性检测过程中,只有2株活性下降相对较少,其余下降相对较多,一般活性下降是抗体结构发生了一定变化,本研究是直接处理抗体而不是在加抗体稳定剂的情况下和抗体使用检测系统来做稳定性,许融等<sup>[24]</sup>用海藻糖作为保护剂用不同方法处理单克隆抗体,表明抗体在有保护剂情况下稳定性会明显提高热稳定性,所以此抗体稳定性实验只是参考,具体的稳定性应该在不同的保护作用和不同的反应体系中去确定。

#### 4 结论

本研究通过 PCR 法扩增木薯 SP 基因并在大肠杆菌中进行蛋白质的原核表达、纯化及其单克隆抗体的制备、纯化和鉴定,首次获得了 SP 单克隆抗体。研制的15株抗 SP 蛋白的单克隆杂交瘤细胞株所产生的抗体,为用免疫学方法检测木薯中不同部位 SP 含量提供基础,也为检测 SP 含量和木薯淀粉含量研究奠定了基础。

#### 参考文献

[1] 陈松笔,安飞飞,朱文丽,等.蛋白质组学在木薯育种中的应用[J].生物技术通报,2015,31(11):18-26.  
 [2] 张鹏,安冬,马秋香,等.木薯分子育种中若干基本科学问题的思考与研究进展[J].中国科学,2013,43(12):1082-1089.  
 [3] 许娟,罗兴录,赵德征.木薯淀粉合成相关基因的克隆及表达分析[J].生物技术通报,2012(11):101-109.  
 [4] 池敏青.木薯块根淀粉积累过程生理生化特性研究[D].南宁:广西

大学,2007.

[5] Myers A M, Morell M K, Martha G, et al. Recent Progress toward Understanding Biosynthesis of the Amylopectin Crystal[J].Plant Physiol,2000,122:989-997.  
 [6] 袁亚芳.水稻淀粉磷酸化酶基因的表达及对稻米品质影响的研究[D].扬州:扬州大学,2007.  
 [7] Lorberth RRG, Willmitzer L, Kossmann J. Inhibition of a starch-granule-bound protein leads to modified starch and repression of cold sweetening[J].Nature Biotechnology,1998,16(5):473-477.  
 [8] 孙红梅,袁思施,王春夏.百合鳞茎淀粉磷酸化酶提取条件的优化[J].植物研究,2009,29(1):54-57.  
 [9] Lloyd J R, Landschutze V, Kossmann J. Simultaneous antisense inhibition of two starch-synthase isoforms in potato tubers leads to accumulation of grossly modified amylopectin[J].Biochemical Journal,1999,338(Pt2)(6):1233-1240.  
 [10] Abel G J W, Springer F, Willmitzer L, et al. Cloning and functional analysis of a cDNA encoding a novel 139 kDa starch synthase from potato (*Solanum tuberosum* L.) [J].Plant Journal,1996,10(6):981-991.  
 [11] Akatsuka T, Nelson O E. Starch granule-bound adenosine diphosphata glucose-starch glucosyltransferases of maize seeds[J].Journal of Biological Chemistry,1966, 241(10):2280-2285.  
 [12] Ozbun J L, Hawker J S, Greenberg E, et al. Starch synthetase, phosphorylase, ADP glucose pyrophosphorylase, and UDP glucose pyrophosphorylase in developing maize kernels[J].Plant Physiology,1973,51(1):1-5.  
 [13] Duwenig E, Steup M, Kossmann J. Induction of genes encoding plastidic phosphorylase from spinach (*Spinacia oleracea* L.) and potato (*Solanum tuberosum* L.) by exogenously supplied carbohydrates in excised leaf discs[J].Planta,1997,203(1):111-120.  
 [14] Berkel J V, Conrds- Strauch J, Steup M. Glucan- phosphorylase forms in cotyledons of *Pisum sativum* L.; Localization, developmental change, *in vitro* translation, and processing[J].Planta, 1991,185(3):432-439.  
 [15] 门福义,毛雪飞,刘梦云,等.马铃薯不同品种淀粉积累生理基础研究[J].马铃薯杂志,1997,11(1):1-6.  
 [16] 陈明明,陈红梅,王素兰.418名狂犬病暴露者抗体检测结果分析[J].医学动物防疫,2016,32(6):702-704.  
 [17] 刘岩,王晶辉,杜慧,等.河北省2011年人群麻疹免疫水平研究[J].中国卫生检验杂志,2015,25(9):1455-1457.  
 [18] 李艳,孙磊,李艳艳,等.规模化牧场奶牛 PAG-ELISA 早期妊娠诊断[J].畜牧与兽医,2016,48(5):49-52.  
 [19] 黄美玲,吴鹏,李天森,等.牛病毒性腹泻病毒 E2 抗原表位表达及验证[J].生物技术,2016,26(2):152-157.  
 [20] 党娟,谢海波,陆苇,等.直接竞争 CLIA 检测试剂盒测定猪肉中磺胺类药物的残留[J].食品与发酵科技,2016,52(2):86-90.  
 [21] 杨代凤,刘腾飞,邓金花,等.标记免疫分析在农兽药残留检测中的应用研究进展[J].中国农学通报,2012,28(30):218-225.  
 [22] 魏继涛,胡延春,宁红梅,等.黄曲霉毒素 B1 完全抗原合成及鼠源多抗血清的制备[J].中国农学通报,2012,28(14):44-49.  
 [23] 丁宁,石心泉,郭永,等.一种快速制备甲胎蛋白单克隆抗体杂交瘤细胞系的方法[J].生殖医学杂志,2013,22(5):306-363.  
 [24] 许融,江涛,李亚鹏,等.海藻糖对单克隆抗体热稳定性保护作用的研究[J].中国食品卫生杂志,2001,13(2):10-12.